

## Fagyasztás hatása élő szervezetekre

### I. A fagyasztás biológiai reverzibilitásának kérdése

BALÁZS OTTÓ

*Konzerv-, Hús- és Hűtőipari Kutató Intézet, Budapest*

#### Bevezetés

Ismeretes, hogy a megfagyott növények vagy növényi szövetek felengedésük után bizonyos esetekben elvesztik turgorukat, megbarnulnak, a sejtek elpusztulnak. A hideg hatására a szervezetek általában elvesztik életképességüket. Ez a folyamat azonban nem minden esetben következik be. Egyes növények, sőt hidegvérű állatok sejtjei is, megfagyásuk után nem mindig pusztulnak el. Ez esetben tehát feltételezhető, hogy a hideg hatására a sejten belül bekövetkező változás biológiailag reverzibilis. A fagyás után megfigyelhető biológiai reverzibilitás kérdése mind gyakorlati, mind elméleti szempontból igen lényeges. A gyakorlat szempontjából csak két kérdésre kívánok rámutatni:

1. Csak kevés növény tenyészideje olyan rövid, hogy fejlődésének egész tartama a mérsékelt éghajlat fagynélküli idejére essék. Azoknál a növényeknél, melyeknél a téli fagy az aktívan működő vegetatív sejteket is éri, az áttelelőképességet a megfelelően nagy fagyállóság, azaz a megfagyás utáni biológiai reverzibilitás magyarázza. Ezért gazdasági növényeink fagytűrésének vizsgálata, a fagytűrő fajták nemesítésének problémája is részben a megfagyás biológiai reverzibilitásának kérdésére vezethető vissza.

2. A növényi élelmiszerek, különösen a gyümölcsök fagyasztott tartósításának tökéletesítése, ill. egyes, ily módon még nem tartósítható gyümölcsfajtáknál e módszer bevezetésének kérdése a sejtek fagyasztás utáni biológiai reverzibilitásának képességén mulik.

Mindkét kiragadott gyakorlati szempont azonban csak a fagyhalál mechanizmusának és a biológiai reverzibilitás kérdésének elméleti vizsgálata alapján közelíthető meg. Ezért, bár kísérleteim a tartósítóipar szempontjainak figyelembevételével készültek, a beállított modellkísérletek során kapott eredmények a sejtekben fagyasztás hatására bekövetkező biológiai változások elméleti tisztázására szolgálnak kísérleti anyagot. Jelenleg még nem teljesen tisztázott az a kérdés, hogy a fagyhalál, azaz a fagyasztás utáni biológiai irreverzibilitás közvetlen előidézője milyen folyamat lehet. Céлом nem is a kérdés eldöntése, hanem az volt, hogy — elsősorban a gyorsfagyasztással történő tartósítás szempontjait figyelembe véve — a fagyasztás külső, fizikai körülményeinek változtatásával keressem azt a fagyasztási eljárást, mely mellett a biológiai reverzibilitás megmarad. A gyorsfagyasztással történő tartósításnál u. i. nemcsak az a cél, hogy a tárolt növényi szervezeteket megóvják a mikroorganizmusok káros tevékenységétől, hanem az is, hogy azok biológiai és élvezeti értékükből a lehető legkevesebbet veszítsenek, s megőrizze ill. megközelítse a friss élelmiszer eredeti jellegét. A gyorsfagyasztásnál tehát arra kell törekedni, hogy az élő plazma fagyasztással megváltoztatott belső struktúrája az egész folyamat, tehát a lehülés és tárolás, valamint a felengedés alatt reverzibilis maradjon.

### *A fagyhalált előidéző tényezők*

Régebbi felfogás szerint (4:35. old., 10:15. old., 11, 14:257. old.) a fagyhalál közvetlen oka a sejtek mechanikai elroncsolódásában keresendő. E felfogás szerint a megfagyott víz kiterjed és szétszakítja a sejtfalakat, illetve a lassú megfagyáskor kialakuló tűkristályok a sejtfalat átszúrják. Ezzel magyarázták azt a tényt, hogy a gyorsfagyasztott növényi sejtek sérülése kisebb, mint lassú fagyasztáskor. A kialakuló jégkristályok nagysága ugyanis a fagyasztás sebességétől függ, a gyorsfagyasztásnál kialakuló szemcsés jégstruktúra nem tudja a sejtfalat »átszúrni«. E felfogás azonban nem mindenben helytálló. Mikroszkópikus megfigyelések alapján úgy látszik, hogy először a sejtfalakat átitató víz fagy meg, a jég főleg a sejtközökben képződik, a fagy hatására elpusztult növények sejtfalai épek maradnak.

Újabb kutatások alapján (4:35 old., 5, 10:13. old.) a fagyáskor fellépő fagyhalál közvetlen oka nem a sejtfalak átszakítása, hanem a protoplazma kolloid struktúrájának megváltozása, koagulálása. E szerint a sejt nedv a jég kifagyása közben egyre koncentráltabbá válik, s a víztelenedő protoplazma kolloid anyagai irreverzibilis változáson mennek át, koagulálnak. A fagyhalál eszerint már a fagyasztáskor bekövetkezik, a felengedés után tehát a protoplazma már elpusztul, impermeabilitását elveszti. Egyes növények sejtjei azonban fagy hatására nem mindig pusztulnak el, felengedés után a növények felélednek, csökkent turgoruk fokozatosan regenerálódnak. A mérsékelt fagyást kibíró növények a hőmérséklet további csökkenésekor mégis elpusztulnak. M a x i m o v szerint (7, 8, 9.) ez azért következik be, mert minél alacsonyabb a hőmérséklet, annál több víz válik szilárd állapotúvá, a protoplazma még nagyobb mértékben víztelenedik, a jégkristályok nyomása fokozódik, s bekövetkezik a plazma koagulálása. Szerinte minden sejtnak saját víztelenedési és összenyomhatósági határa van, amin túl elhal. Tehát e határ túlhaladása okozza a sejt halálát, azaz a fagyhalál okául kizárólag a víz kifagyása következtében a plazmában előálló dehidratációt tekinti.

### *A fagyasztás utáni biológiai reverzibilitás kérdése*

A sejtek fagyhalálát valószínűleg nem csupán a fent említett, elsősorban mechanikus hatások okozhatják. Biológiai szempontból a tökéletes reverzibilitás azt jelenti, hogy a lehűtött vagy megfagyott élő szervezet a felengedés után normális életműködését tovább folytatja. Ez a tökéletes »biológiai reverzibilitás« egyben azt is jelenti, hogy a sejtben lévő enzimek működése a felengedés után továbbra is organizált marad, s nem válik nekrotizáló ill. autolizáló jellegűvé. A hőmérséklet csökkenése az egyes enzimek működését lényegesen lassítja, ami természetes, ha meggondoljuk, hogy az enzimek működése kémiai folyamat, melynek reakciósebessége a hőmérséklet függvénye. Az enzimműködés sebessége hűtés közben 10 C°-onként kb. felére csökken (Van't Hoff-féle Q<sub>10</sub> szabály) a megfagyás pillanatában azonban az enzimaktivitás görbéje meredeken esik (12). Ez utóbbi változás részben azzal magyarázható, hogy a kifagyás pillanatában a rendszerben fázisváltozás következik be, s a szilárd fázis csökkenti az enzimműködés sebességét, másrészt a prosztesztikus csoportot hordozó duzzadt fehérje reverzibilisen dehidratálódik. Kérdéses azonban, hogy gyors fagyasztásnál, mikor az adott állapotot »befagyasztjuk«, mi történik az enzimrendszerekkel.

A hőmérséklet csökkenése az enzim-láncokban szereplő egyes enzimekre nem egyformán hat, így pl. a légzési folyamatban résztvevő enzimek hőérzékenysége sem azonos, egyes enzimek működése még a növény fagyasztott állapotában sem szűnik meg teljesen (6:97. old., 14:309 old., 10:23. old.). Az enzimrendszerek

organizált működéséhez szükségszerűen feltételezendő összhang tehát fagyasztás hatására megbomolhat. Az enzimek aktivitásukat a fagyasztás hatására nem veszítik el. A kataláz pl. még  $-20^{\circ}\text{C}$ -on is aktív, egyes mikrobiológiai megfigyelések (Csiba, Butjagin) pedig azt mutatják, hogy a fagyhatás befejeződése után az enzimek működésének aktivitása fokozódik (3, 4 : 41. old., 14 : 782. old.). Ha tehát tekintetbe vesszük, hogy fagy hatására a sejtfalak sérülése nem következik be, vagy csak legfeljebb néhány sejt pusztulását okozhatja, és hogy egyes esetekben a fagyasztás reverzibilis, a sejtek fagyhalála részben a fagyasztáskor és az utána bekövetkező felengedéskor megzavart, »egyensúlyát veszített« enzimrendszer dezorganizált működésének tekinthető. Alátámasztja ezt a felfogást az a gyakorlati megfigyelés is, hogy széndioxid vagy inert gáz-atmoszférában fagyasztott, vagy előzőleg narkotikumokkal kezelt növényi szövetek a fagyasztás után nem, vagy csökkentett mértékben mutatják ugyanazokat a tüneteket (barnulás, konzisztencia változás), melyek a fagyhalál jellemzői (1, 4). E szempontok alapján felmerülhet az a kérdés, hogy vajon a plazma koagulálása elsődleges folyamat-e, azaz hogy a sejtek fagyhalálát az enzimatiszus folyamatok fagyasztás hatására bekövetkező változása milyen mértékben befolyásolja.

### Kísérletek anyaga és módszerei

#### *A »modellkísérletek« szükségessége*

Magasabbrendű növények esetében igen nehéz az egyed fagyhalálát okozó tényezőket részeire bontani. Nem lehet eldönteni, hogy vajon a fagyhalál az egyes sejtekben külön-külön lejátszódó dezorganizációs folyamat, vagy pedig esetleg más, az egyed magasabbrendű élettani tevékenységének ill. ezek egyensúlyának megbomlása okozza-e a növény pusztulását. Ugyanakkor egyéb kísérleti nehézségek is fellépnek, így pl. magasabbrendű teljes növény fagyasztása, valamint a sérülés fokának megállapítása igen körülményes. A növény fejlődési stádiumának szerepe sem eldöntött.

Kiemelt növényi szövetek, vagy levágott növényrészek, pl. gyümölcsök kísérleti vizsgálata is több elvi és gyakorlati akadályba ütközik. Ilyen elvi akadály pl. az, hogy a törzstől való elválasztás után az aktívan működő növényrész élettani szempontból sok tekintetben eltérő viselkedésű, mint a növénytel szervesen összefüggő.

Ilyen szempontok alapján a fagyasztás utáni biológiai reverzibilitás kérdésének vizsgálatához egyelőre biológiai modellekhez kellett folyamodnom. Modellként elsősorban mikroorganizmusok jöhetnek számításba. Az ugyanis, hogy a mikroba-sejtek fagyasztás és felengedés után életben maradnak-e vagy sem, könnyen eldönthető szaporodásuk vizsgálatával. A sejtszám alakulásának mérésével pedig egyben a többi életfontosságú funkciók terén bekövetkező változásokra is következtetni lehet. A fagyasztás és az utána következő felengedés hatására mutatózó élő sejtszám-változás tehát a kezelés hatását igen jól tükrözi, ezért ebből a különböző eljárások hatására bekövetkező sejttállomány »sérülések«, valamint a reverzibilitás »foka« mennyiségi méréssel követhető.

A »biológiai modelleken«, tehát a mikroba-sejteken kapott eredményeket természetesen nem lehet közvetlenül a magasabbrendű szervezetekben lejátszódó folyamatokra vonatkoztatni. Az így nyert adatok csak a modellen végbemenő folyamat mechanizmusának megvilágítására szolgálhatnak. A magasabbrendű szervezetekben lejátszódó folyamatok közvetlen tanulmányozására kidolgozandó módszer azonban a modellkísérletekkel kapott eredményekre támaszkodhatik. E mód-

szer valószínűleg a fagyasztott állapotban történő légzés-intenzitás változásán alapulhat. E különleges feladat megoldására alkalmas, »bifunkcionális« respirométert szerkesztettem. Ez természetesen csak a biológiai reverzibilitás lehetőségének eldöntése után vált indokolttá.

Kísérleteim modelljeül *Saccharomyces*-törzseket választottam. Azok könnyű kezelhetőségén kívül ezt az a meggondolás is indokolja, hogy az élesztők alacsony hőfokon mutatkozó viselkedésének ismerete fontos a gyorsfagyasztott tartósítás nézőpontjából is, mert a gyümölcsök mikroflórájában gyakran sok az élesztő. Egyben az élesztővel foglalkozó iparágak (bor-, szeszipar, stb.) is hasznosíthatják az e téren szerzett tapasztalatokat.

### A kísérletek elvi elrendezése és módszerei

A gyorsfagyasztással történő tartósítás több évtizedes tapasztalatai, valamint a Konzerv Hús- és Hűtőipari Kutató Intézetben végzett ezirányú kísérletek és az irodalmi adatok (4, 6, 10-12, 14, 16) azt mutatják, hogy az élő anyag (gyümölcsök, főzelékek) fagyasztás hatására történő változását főleg három tényező-csoport befolyásolja:

1. a hűtés sebessége és az elért végső hőfok,
2. a fagyott állapot időtartama és közben az anyag hőfoka (a tárolás tartama és hőfoka),
3. a felengedés ideje és módja.

Ezek hatását kívántam tanulmányozni a biológiai reverzibilitás szempontjából. Kísérleteimet elsősorban a következő szempontok szerint állítottam össze, ill. a következő kérdéseket kívántam megvizsgálni:

#### A) Minőségi vizsgálatok:

a) Vajjon a kiválasztott modell-sejtek életben maradnak-e a különböző véghőmérsékletű, különböző sebességű fagyasztás után.

b) A fagyasztás különböző véghőmérséklete, illetve a fagyasztás és a felengedés sebessége miként befolyásolja a modell-sejtek életben maradását.

c) A megfagyasztott élesztőtörzsek életbenmaradása függ-e a különböző élesztőtörzsek fajtulajdonságaitól, azaz hogy az élesztősejtek modell-szerű felhasználása lehetséges-e. Más szóval, hogy a fagyasztott élesztőtörzsek életbenmaradása nemcsak egyes különleges, hidegtűrő törzsek speciális tulajdonsága-e.

E kérdések eldöntésére a Konzerv-, Hús- és Hűtőipari Kutató Intézet élesztőgyűjteményéből 66 különböző fajtájú élesztőtörzset Petri-csészébe öntött agar-agaros malátatáptalajra oltottam. Mindegyik törzsből 3—3 áttöltést végeztem normál platinakacsal. Három nap múlva, miután a telepek már elég nagyra fejlődtek, de még teljes kifejlődésük előtt, a három párhuzamos leoltás közül egy sorozatot gyorshűtéssel, sóoldatba merítve  $-40^{\circ}\text{C}$ -ra, egy sorozatot pedig aránylag lassan, vattaburkolattal ellátva légterben  $-20^{\circ}\text{C}$ -ra hűtöttem. Hűtés után mindkét sorozatot  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltam. Egy sorozat kontrol volt.  $+30^{\circ}\text{C}$ -os termosztátban. A hűtőtárolás alatt a telepek mérete nem változott, fejlődés nem volt. Egy heti  $-20^{\circ}\text{C}$ -on történő tárolás után mindkét hűtött sorozatból néhány mintát folyékony táptalajba oltottam annak eldöntésére, hogy a tenyészetek élnek-e. A táptalajt másnapra erjedt. További egy heti tárolás után a tenyészeteket különböző felengedési sebesség után  $30^{\circ}\text{C}$ -os termosztátba helyeztem a felengedés utáni növekedés megfigyelésére.

#### B) Mennyiségi mérés:

A különböző fagyasztási sebesség és az elért végső hőfok miként befolyásolja az élesztő-tenyészet élő sejtszámának alakulását.

A következő módszert alkalmaztam. 700—700 ml 5%-os cukortartalmú maláta táptalajba 2—2 gr sültélesztőt szuszpendáltam. (*Sacch. cerevisiae*, a Mezőkémia Ipartelepek V. 3. sz. anyaelesztője.) A szuszpenziókat igen gyorsan 100—100 ml-es részletekben 6—6 300 ml-es Erlenmeyer lombikba mértem. Az így különválasztott, egyforma kezdeti-csíraszámú szuszpenziók közül 5—5-öt különböző sebességgel azonnal lehűtöttem, a »kontrol-tenyészetekből« ugyanakkor megállapítottam a kezdeti sejtszámot. A kísérletet háromszoros ismétléssel állítottam be.

A kezelések módja a következő volt, a tenyészetek sorszámai szerint:

1. kontrol:  $+26^{\circ}\text{C}$ -os termosztátban.
2.  $0^{\circ}\text{C}$  körül: elektromos jégszekrény tároló terében.
3.  $-20^{\circ}\text{C}$ -ra lassan: többszörös vattaszigeteléssel körülvéve,  $-20^{\circ}\text{C}$ -os tároló légterében hűtve.
4.  $-20^{\circ}\text{C}$ -ra gyorsan:  $-20^{\circ}\text{C}$ -os sólébe merítéssel hűtve.
5.  $-40^{\circ}\text{C}$ -ra lassan: többszörös vattaszigeteléssel körülvéve  $-40^{\circ}\text{C}$ -os léghűtőben hűtve.
6.  $-48^{\circ}\text{C}$ -ra gyorsan:  $-48^{\circ}\text{C}$ -os sólébe merítéssel hűtve.

A hűtött tenyészeteket 24 óra elteltével felengedés és továbbtenyésztés végett  $+26^{\circ}\text{C}$ -os termosztátba helyeztem.

Az élő sejtek számának meghatározását lemezöntéses számlálási módszerrel végeztem. E módszerrel történő sejtszámlálással a kapott eredmények csak akkor esnek az elfogadható hibahatárok közé, ha az egy-egy hígításból származó 3—3 ismétlésben a 10—12 cm-es Petricsészékben fejlődött telepek száma lehetőleg 50—400 között van. Ezért minden minta  $10^6$ ,  $10^7$  és  $10^8$ -szoros hígításnak 3—3 ismétléséből középértékkeléssel kiszámolt sejtszám három párhuzamos kísérletből összesített eredményét tekintem az élő sejtszám valódi értékéül, azzal a megszorítással, hogy a számítások alapjául mindig azzal a hígítással kapott értéket választottam, ahol a megszámlolt telepek száma lehetőleg a fentemlített határok közé esik. Sajnos élő sejtszám szabatos megállapítására könnyebben kezelhető és pontosabb módszer nincs. Az utóbb említett követelményt sem tudtam minden esetben betartani, mert az előre nem várható alacsony sejtszámok esetén a legalacsonyabb felhasznált hígítás is 50-nél kevesebb telepet mutatott, ez azonban nem okoz átlagosnál nagyobb hibát. Szokásos módon a sejtszám értékeit logaritmusból adom meg, ezek maximális ingadozása átlag  $\pm 0,1$ . A kísérleti adatok értékelésének, valamint az egyes minták sejtszám-értékei ingadozásának bemutatására az 1. sz. táblázat szolgál, mely a »kontrol-tenyészet« sejtszám változásának részletes adatait tartalmazza.

1a. táblázat  
A fejlődési görbe alapjául szolgáló élő sejtszám értékeinek meghatározása a  $+26^{\circ}\text{C}$ -on tárolt kontroltenyészetekben

1) Sorszám	(2) Leolvasott sejtszámok középértékei								
	hígítás $10^6$			hígítás $10^7$			hígítás $10^8$		
1.	28	29	24	4	—	4	1	0	0
2.	64	54	74	6	7	6	0	1	2
3.	532	501	515	57	50	62	12	8	12
4.	817	786	767	89	98	85	14	24	18
5.	$\infty$	$\infty$	$\infty$	95	95	100	16	12	18
6.	$\infty$	$\infty$	$\infty$	135	140	145	20	19	17
7.	$\infty$	$\infty$	$\infty$	127	117	100	9	15	14

1b. táblázat  
A fejlődési görbe alapjául szolgáló élő sejtszám logaritmus értékeinek alakulása

(1) Sorszám	(3) Leolvasott sejtszámértékek logaritmusai									(4) Értékelhető sejtszám log. k. é.	(5) Maximális hiba
	1. csoport			2. csoport			3. csoport				
1.	7,45	7,46	7,38	7,60	—	7,6	8,00	—	—	7,4	± 0,04
2.	7,81	7,73	7,87	7,78	7,84	7,78	—	8,00	8,30	7,8	± 0,07
3.	8,72	8,70	8,71	8,75	8,70	8,80	9,08	8,84	9,08	8,7	± 0,01
4.	8,91	8,89	8,89	8,94	8,99	8,93	9,15	9,38	9,25	8,9	± 0,1
5.	∞	∞	∞	8,98	8,98	9,00	9,20	9,08	9,25	9,0	± 0,02
6.	∞	∞	∞	9,13	9,15	9,16	9,30	9,28	9,23	9,1	± 0,05
7.	∞	∞	∞	9,10	9,07	9,00	8,80	8,95	8,90	9,1	± 0,05

Az 1a. táblázat a különböző hígításoknál talált telepek számát mutatja, 3—3 ismétlés középértékében. Az 1b. e számok két érték pontossággal számolt logaritmusait valamint a fent ismertetett elv szerint számolt értékelhető logaritmus-sejtszám értékeket tartalmazza, míg

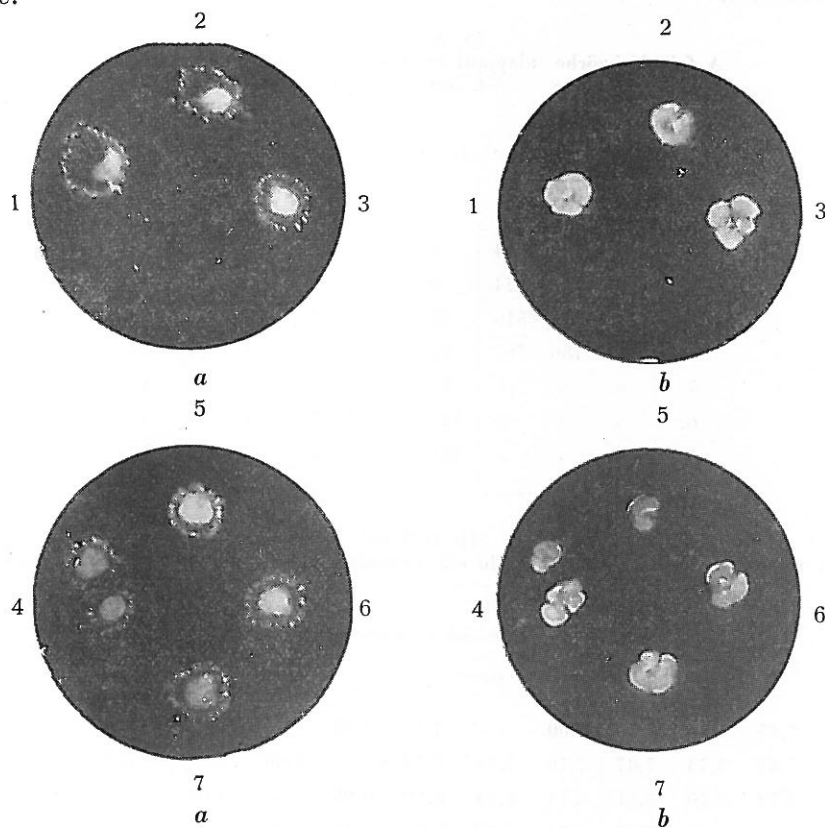


az utolsó hasáb az értékek legnagyobb ingadozását mutatja. Látható tehát, hogy a fejlődési görbe megrajzolásánál alapul vett logaritmikus érték első tizedese még kellő biztonsággal megadható.

Kísérleteim kiegészítésére magasabbrendű, fejlődésben lévő szervezetek fagyasztás utáni biológiai reverzibilitását tanulmányoztam, mikroszkóp alatt fagyasztott halembrió viselkedésén.

*A fagyasztás különböző végső hőfoka és a fagyasztás, valamint a felengedés sebességeinek hatása élesztő tenyészetek óriás-telepeinek alakulására*

A minőségi megfigyelések eredményei egybehangzóan azt mutatják, hogy az élesztőtörzsek mind kibírják a fagyasztás hatását, a telepek nem pusztulnak el, bármilyen volt is a fagyasztás, ill. a felengedés sebessége. Érdekes azonban, hogy a telepek 30 C°-on történő továbbfejlődése sugár irányú, nem tömör, mint ahogy az a kontrol megfelelő korú telepein látható. Az 1. ábrán néhány telep felvételét mutatom be.



1. ábra

Különbőféle fajtájú élesztő óriás-telepek. a) fagyasztott, b) azonos fajtájú és korú kontrol. 1-, 2. és 3.: —20 C°-ra; 4, 5, 6. és 7.: —40 C°-ra történt fagyasztás után

Az a)-val jelzett ábrák a fagyasztott, a b)-vel jelzettek az azonos fajtájú kontrol-telepek képét mutatják. A felvételek idején a fagyasztott és kontrol-tenyészetek — a fagyasztott kultúrák tárolási idejének levonásával — azonos korúak. Szabályos, tömör tovább-növekedést a 66 fajta közül mindössze néhány gyorsan hűtött és felengedett fajtánál találtam, de ez nem általánosítható.

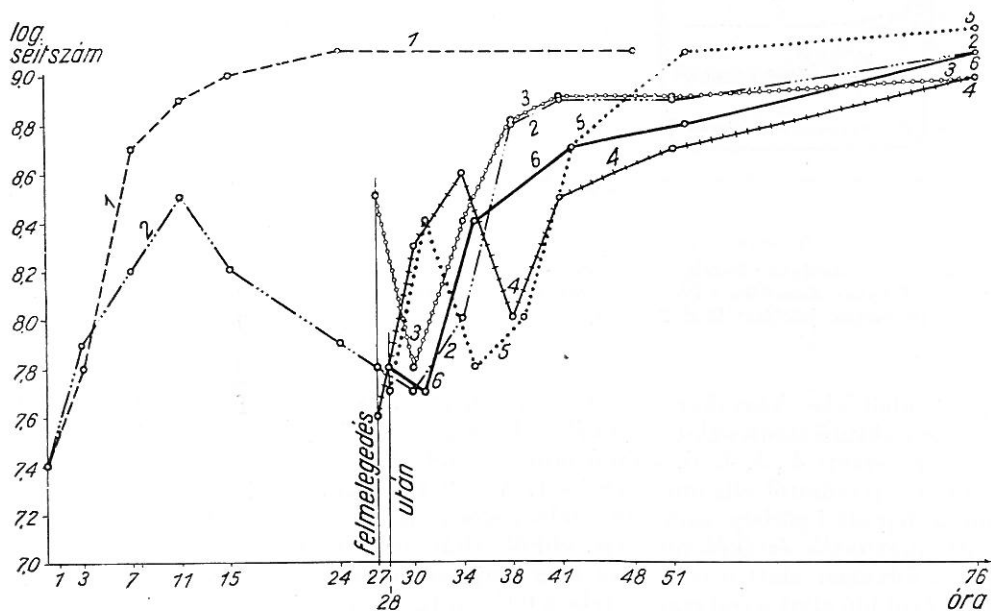
A telepek sugárirányú továbbnövekedése valószínűleg azzal magyarázható, hogy agar-agaros táptalajból alacsony hőmérsékleten a víz kifagy s kristályos, jégvirágszerű struktúrát mutat. A jégkristályok mentén a táptalaj cukorkoncentrációja megváltozik s ez jelentkezhethet a telepek felengedés utáni sugárirányú szaporodásában.

E tájékozódó jellegű megfigyelések tehát azt mutatják, hogy mind a 66 felületen tenyésztett élesztőfajta a fagyasztás után tovább tudott szaporodni, a fagyasztást tehát a sejtek túléltek. Az eredményből látható egyben az is, hogy az élesztőtörzsek fagytűrése nem fajtatulajdonság.

*A fagyasztás különböző sebessége és az elért végső hőfok hatása élesztő-tenyészetek élő sejttségének alakulására*

Fent ismertetett kvalitatív megfigyelések szerint az élesztő-tenyészetek a fagyasztás hatását fajtától függetlenül túléltek. A fagyasztás hatására bekövetkező biológiai folyamatok vizsgálatára azonban a tenyészetek fejlődési görbéjében mutatkozó változások tágabb következtetésekre is alapot szolgáltatnak.

A különböző módokon fagyasztott tenyészetek logaritmusban megadott sejttség-értékeinek időbeli alakulását mutatja a kísérlet tényleges elrendezése szerint a 2. ábra.



2. ábra

A különböző módokon kezelt élesztőtenyészetek fejlődési görbéinek időbeli alakulása a kísérlet tényleges elrendezése szerint 1: kontrol; 2: 0 °C körül; 3: -20 °C-ra lassan hűtve; 4: -20 °C-ra gyorsan hűtve; 5: -40 °C-ra lassan hűtve; 6: -48 °C-ra gyorsan hűtve

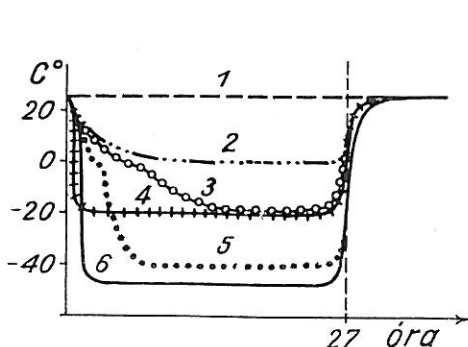
A 2. ábrából látható, hogy a kontrol és a 0 °C körüli hőmérsékleten tárolt tenyészetek sejttségét az alap-szuspenzió elkészítésétől kezdve, a fagyasztotakat pedig 24 óra elteltével +26 °C-os termosztátban megtörtént felengedésük után számláltam. Ezeknél tehát az első minták sejttség értékei a +10 °C-ra felen-

gedett állapotot mutatják. A fagyott tenyészeteket közvetlenül  $+26\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os termosztátba tettem felengedés végett, s a számlálás befejeztéig ebben tartottam. A 3. ábra a tenyészetek hőfokának változását szemlélteti.

Az adatok alapján a következő megfigyelések tehetők:

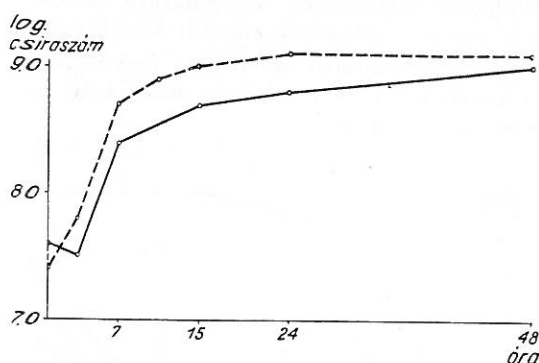
$0\text{ }^{\circ}\text{C}$  körüli hőmérsékleten — ahol a tenyészet nem fagyott meg, a sejtszám változása tehát közben is figyelhető — a hőfok csökkenése ellenére is a sejtszám eleinte emelkedő tendenciájú, majd süllyedni kezd. Kb. 10 óra folyamán a csíraszám átlag 1 nagyságrenddel emelkedik, s a 27. órára megközelítőleg ismét eléri a kezdeti sejtszám értékét, maximumot tehát 10 óra múltán mutat.  $+26\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os termosztátban a sejtszám a jellegzetes visszaesés után éri el a tápoldat kiterjedését jelző végső sejtszám értékét. A  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  körüli hőmérsékleten a sejtek tehát pusztulnak.

A fagyasztott tenyészetekből, a megszilárdult tápoldatokból a hűtés tartama alatt mintát venni nem tudtam, a sejtszám alakulása tehát nem követhető, így a hűtés alatt lejátszódó folyamatokra csak a felengedés után mért kezdeti



3. ábra

A különböző módokon kezelt élesztőtenyészetek hőfokának alakulása a kísérlet folyamán (a görbék jelölését lásd 2. ábra)



4. ábra

A kontrol és a  $-48\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra gyorsan fagyasztott élesztőtenyészet fejlődési görbéinek összehasonlítása

sejtszámból lehet következtetni. Feltételezhető, hogy a gyorsfagyasztás folyamán és az azt követő tárolás alatt sem változik a sejtszám. Ezt mutatja az aránylag gyorsan fagyasztott 4., 5. és 6. számú minták, melyek sejtszáma a felengedés után a kezdeti sejtszámtól alig mutat eltérést. A  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra lassan hűtött tenyészet (3. sz. minta) fejlődési görbéje azonban a felengedés után a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolt tenyészet hűtés alatti maximális értékét mutatja, ebből tehát az következtethető, hogy a lassú hűtési folyamat alatt a tenyészet még szaporodhatott. Felengedés után azonban igen rövid idő alatt a sejtszám értéke a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolt minta értékével majdnem azonos értékre esik és nagyjából a továbbiakban is azzal azonos lefutású.

A  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra gyorsan (4. sz. minta), a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra lassan (5. sz. minta) és a  $-48\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra igen gyorsan (6. sz. minta) fagyasztott tenyészetek felengedés utáni sejtszáma kb. azonos alacsony értéken marad, mint a fagyasztás előtti élő sejtszám. A megfagyás előtt tehát észrevehető sejtszám-gyarapodás nem mutatkozott. A  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra gyorsan és a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra lassan fagyasztott tenyészetek (4–5. sz. minta) sejtszáma eleinte igen gyors növekedést mutat, de a végső sejtszám elérése előtt ezek sejtszámai is alacsony értékre, majdnem a fagyasztás előtti értékre esnek s e minimum-értékről tovább szaporodva érik el a végső sejtszámot.



Igen érdekesen alakul a  $-48^{\circ}\text{C}$ -ra gyorsan fagyasztott tenyészetek fejlődési görbéje. A gyorsan fagyasztott tenyészetek sejtszám-értékeinek változása ugyanis, mint az a 4. ábrán egymás mellé helyezett görbékből is látható, a nem fagyasztott kontroltenyészet értékeivel majdnem párhuzamosan halad. Eltérés mindössze abban mutatkozik, hogy a logaritmikus szakasz valamivel rövidebb, a tenyészet károsodása tehát leginkább a sarjadzás intenzitásának sebességében mutatkozik. Az élő sejtszám változása állandóan emelkedik, visszaesés — a másként fagyasztott tenyészetek fejlődési görbéitől eltérően — nem látható.

A gyorsan, alacsony végső hőfokra hűtött tenyésztől eltekintve tehát az összes többi kezelt tenyészet a felengedés után a kezdetben kialakuló magasabb sejtszámról visszaesik és csak a szaporodási görbe további szakaszán alakul többé-kevésbé szabályos lefutásúvá. A fagy hatására tehát e tenyészetekben a »biológiai károsodás« igen valószínű, bár a sejtek nem pusztulnak el közvetlenül a fagy hatására. Megjegyzendő, hogy a károsodás viszonylag magasabb hőfokra lassan hűtött, tehát a  $-20^{\circ}\text{C}$ -ra lassan fagyasztott és a  $0^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten tartott tenyészetek esetében a legnagyobb. Ez megerősíti azt az irodalmi adatot (pl. *Csisztjakov*), mely szerint a  $0^{\circ}\text{C}$  körüli hőmérséklet a mikroorganizmusokra igen káros (3.; 4: 42. oldal).

### *Fejlődő halikrákkal végzett kísérletek*

A biológiai reverzibilitás kérdésének vizsgálatára kísérleteket végeztem magasabbrendű, differenciált, fejlődésben lévő szervezetekkel is. E kísérletek elvégzésére igen jó anyagnak bizonyult a fejlődésben lévő halamebrió. A magasabbrendű szervezetek közül tudvalevően a hidegvérűek, de különösen a halak legellenállóbbak a fagyasztás káros hatásának. Így pl. Plank kínai pontyot, Kubányi vörösszárný köncsért fagyasztott s a halak fagyasztás után vízbe téve tovább éltek (13). A kísérleteimet méretei folytán könnyen kezelhető csukaikrákkal végeztem. A kísérleti anyagot az Állattenyésztési Kutató Intézet Haltenyésztési Osztályáról Voinarovits Elek bocsátotta rendelkezésemre.

Első kísérleteimet megtermékenyített, 4—5 napja fejlődő csukaikrákkal végeztem. Az ikrákat vízben vagy víz nélkül kémcsőben különböző módokon fagyasztottam. Néhány napos tárolás után felengedve, a megfagyott ikrák közül egy sem volt életképes. Az ikrák összeestek, fehérjéjük koagulált, a környező víz nyálkás, zavaros lett. Kémcsőben történő fagyasztás esetén az alkalmazott hűtési körülmények mellett az ikrák fagy hatására elpusztulnak.

A fagyasztás közben végbemenő változás figyelemmel kísérése végett kikelés előtti, teljesen fejlett embriókkal végeztem további kísérleteimet. A csukaembriók kb. 14—15 napos korukban annyira fejlettek, hogy az ikrákon belül az embriók jól láthatók, szív-működésük lüktetése is figyelhető, tehát a fagyasztás és az azt követő felengedés hatására bekövetkező változások a szív-működés viselkedésén tanulmányozhatók. Az 5. ábra ilyen fejlődési stádiumában lévő csukaembriókról készült felvétel.

Az embriók szíve normális életkörülményeik között percenként átlag 150-szer pulzál.

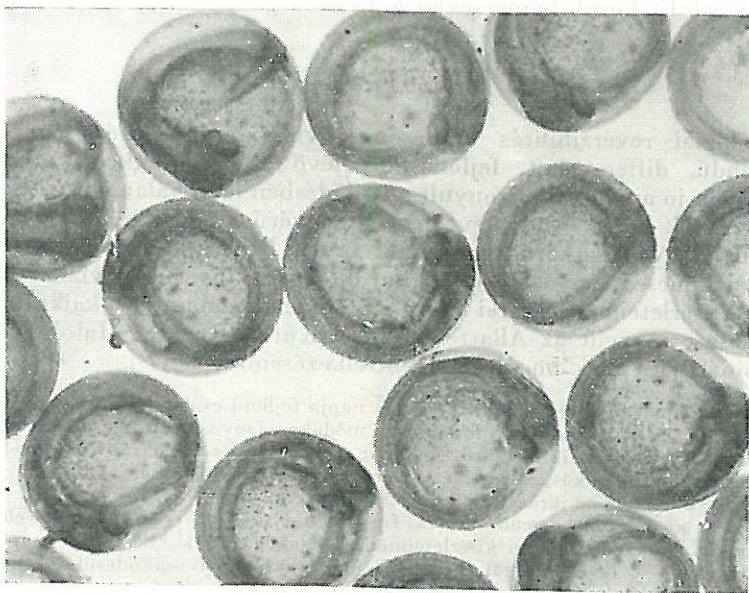
Megfigyeléseimet fagyasztó-asztallal ellátott mikroszkóppal végeztem. Az ikrákat vékonyabb vagy vastagabb üveglapokon keresztül  $\text{CO}_2$ -vel fagyasztottam. Egy-egy látótérben átlag 5—8 ikra volt. A megfigyeléseket 10—10, a híg sóoldatban történő fagyasztás esetén 25-szörös ismétléssel végeztem.

Vízben lassan fagyasztva az embriók szív-működése egyre csökken,  $0^{\circ}\text{C}$  körül teljesen megáll. A megfagyás pillanatában az egész ikra elveszti átlátszó jellegét, opálos gömb látható csupán. Felengedés után is opálos marad, nem életképes.

Lassú fagyasztásnál az embriók megrázkódnak, szív-működésük egyre lassul, de szemmel láthatóan növekszik a pulzálás amplitúdója. Megfagyás előtti első rándulásnál (hideg-inger) a hűtés folyamatát megszüntetve  $+20^{\circ}\text{C}$ -os vízben szív-működésük ismét rendes lesz. Az első hideg-inger után tovább fagyasztva az

embriók még néhányszor összerázkódnak. A megfagyás előtti pillanatban szív-működésük teljesen megáll.  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízbe téve első percben hullamerevek, érintésre, mozgásra nem reagálnak. Kb. 3—4 perc múlva szív-működésük ismét megindul. Az embriók alakja épen marad, csak a külső burok veszt rugalmasságából. Később a külső burok teljesen összeesik, turgorát elveszti, az embriók összehúzódnak. Ilyenkor szív-működésük még rendes, csak lassúbb, mint a fagyasztás nélkülieké, percenként kb. 100. Néhány perc múlva a szív-működés mindinkább lassodik, s az embriók farki részüktől kiindulva opálósodni kezdenek és ahogy ez a szívet eléri, elpusztulnak.

Fentieknél sokkal jobb eredményt mutat a 0,85%-os konyhasóoldatban történő gyors fagyasztás. A híg sóoldatba helyezett embriók szív-működése még órák múltán is normális. A külső burok turgora kissé csökken. Az embriók érintésre nem reagálnak. Fagyasztás alatt az embriók nem mozognak, csak szív-működésük csökken, majd megszűnik. A sóoldat gyors megfagyása után (alacsony végső hőfokon) az ikrák teljesen átlátszóak maradnak. Az átlag 5 perccig fagyasztott



5. ábra

Fotó: Vojnarovits E.

14—15 napos halembrió mikroszkópos képe

állapotban tartott ikrák gyors felengedése után  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on a megfagyasztott embrió nagyobb száma (több mint 100 egyed) életben maradt, csak néhány — láthatóan sérült — pusztult el. Szív-működésük 2 perc múlva megindult és rövid idő alatt normálissá vált, illetve kissé gyorsult (kb. 160 percenként). A külső burok turgora csökkent. A fagyasztott ikrák 3 óra múlva is éltek, bár az egyedek szív-működése aritmiássá vált, ennek oka azonban valószínűleg levegőhiány.

Idősebb csuka-embriókkal végzett mikroszkópos megfigyeléseim tehát azt mutatják, hogy a híg sóoldatban igen gyorsan alacsony hőfokra hűtött és kellő sebességgel felengedett egyedek nagyobb száma a fagyasztást követő felengedés után életben maradt, azaz »biológiailag reverzibilisen« viselkedett. A fagyás

következtében szükségszerűen előálló változás a szív működés teljes megszűnése alapján megfigyelhető volt. Néhány egyed azonban optimális hűtési és felengedési körülmények között is — részben ismeretlen okból — elpusztult. A folyamat mennyiségi értékelése még nem állt módomban. A sóoldat szerepe még nem kellően tisztázott. Valószínű, hogy a hűtés sebességének fokozása mellett a sóoldat hatására az ikra burkának turgora is változik, ami a reverzibilis fagyasztásra előnyös. E kérdésre vonatkozó vizsgálataimat a következő tenyésztésben folytatom.

### A kísérletekből vonható következtetések

Az ismertetett kísérletek is igazolják, hogy a megfelelően alkalmazott fagyasztás hatására az élő sejt nem pusztul el. Pusztán külső körülmények megfelelő változtatásával a »biológiai reverzibilitás« fenntartható. A közölt kísérleti eredmények, valamint a gyorsfagyasztó ipar gyakorlata egybehangzóan azt mutatják, hogy a biológiai reverzibilitás, azaz a sejtek legkisebb károsodása a lehető leggyorsabb, minél alacsonyabb végső hőfokra történő lehűtésnél következik be.

A sejtek pusztulásának, illetve életbenmaradásának, azaz biológiai reverzibilitásának kérdése igen összetett. Mint az ikrákkal végzett kísérletek is megmutatják, nem hagyható figyelmen kívül a sejtek mechanikai sérülése sem. Igen lényeges szerepe van a megfagyás közben a plazmában szükségszerűen fellépő hidratációs változásoknak is, a sejtek pusztulásakor bekövetkező plazma-koagulálás azonban nem elsősorban a fagy hatására létrejövő jelenség. A sejtek fagyhalála esetén létrejövő koagulálás tehát inkább másodlagos folyamat. Mint már a bevezetőben is említettem, a fagyhalál után megfigyelhető koaguláció sokkal inkább enzimikus folyamatokra vezethető vissza, mint ahogyan arra már az irodalomban is többen utaltak (4:44. old., 15). Az irodalom a koagulálási, dehidratálási folyamatok mellett azonban csak az egyes enzimek aktivitásának csökkenéséről tesz említést, és nem tulajdonít kellő szerepet az enzيمrendszer organizált működésének szükségszerű megzavarásából származó irreverzibilis változásokhoz vezető folyamatoknak.

A sejtek pusztulása ezek szerint nem közvetlenül a megfagyás tényének következménye. A megfagyást a sejtek túlélhetik, mint az élesztő-tenyészeteknél megfigyelhető, sőt lassú lehűtés esetén a sejtgyarapodás egy ideig még folytatódhat. A  $-20^{\circ}\text{C}$ -ra gyorsan, a  $-40^{\circ}\text{C}$ -ra lassan, ill.  $-48^{\circ}\text{C}$ -ra gyorsan fagyasztott tenyészetek felengedés után mért élő sejtszám értéke a fagyasztás előtti élő sejtszámmal jó közelítéssel megegyezik. A felengedés után mért fejlődési görbék azonban a hűtés módja szerint változó képet mutatnak. A fejlődési szakasz *minden esetben* megnyúlik. A  $-20^{\circ}\text{C}$ -ra gyorsan, ill. a  $-40^{\circ}\text{C}$ -ra lassan hűtött tenyészetek élő sejtszáma eleinte rohamosan emelkedik, de ezután a visszaeső fejlődési görbe szerint igen sok sejt elpusztul és csak ezután közelítik meg a görbe szabályos menetét. Ez minden bizonnyal azt jelenti, hogy bár a sejtek nem pusztulnak el, a viszonylag kevésbé alacsony végső hőmérsékletű ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), ill. lassú hűtés esetén, nagyrésztük olyan *belső*, az enzimek organizált működését érintő változást szenved, hogy valószínűleg sem önmaguk, sem utódaik nagy része nem marad huzamosabb ideig életképes. E »beteg« sejtek elpusztulása és a tenyészet »regenerálódása« tehát időt vesz igénybe s ezalatt a fejlődési görbe ingadozást mutat.

Mi lehet azonban a *belső* változás? Feleletet ad erre a  $0^{\circ}\text{C}$ -on tartott és a  $-20^{\circ}\text{C}$ -ra lassan fagyasztott tenyészetek értékelése. A  $0^{\circ}\text{C}$ -on tartott tenyészet sejtszáma kezdeti emelkedés után már a hűtés közben csökken. Ez is azt mutatja,



hogy a sejtekben belső változás történt. 0 °C-on a tenyészet nem fagyott meg, jégkristály okozta mechanikus sejtfal elroncsolódás vagy dehidratálódás tehát nem okozhatta a sejtek közvetlen pusztulását. Ebben az esetben a pusztulást okozó változás kizárólag a sejtek belső életfolyamataiban lehetséges és ez első sorban enzimatiskus változás lehet. E kísérlet is világosan mutatja, hogy a fagyhalál egyik tényezője a fagyasztással megzavart enzimrendszer. Élesztő-tenyészet esetében nem dönthető el, hogy vajon az eredetileg hűtött sejtek pusztultak el vagy csak az utódok válnak életképtelenné. Kizárólag a sejtszám csökkenése regisztrálható. A plazma koagulálása tehát a dezorganizáció felé hajló enzimműködés következménye lehet. Igen jó példa erre a víz nélkül fagyasztott halikrákon tapasztalt jelenség, mikor a felengedés után az embrió szív működése megindul, a szervezet első pillanatban biológiailag reverzibilisen viselkedik, mégis, a szívtől távolabb eső helyeken elindul, a szív felé tartó aránylag lassú folyamat hatására a sejtek plazmája koagulál és pusztulását eredményezi. E viszonylag lassú koagulálási folyamat inkább a dezorganizálódott enzimműködés hatására vezethető vissza, mint a dehidratációs koagulálási folyamatra. Utóbbi esetében u. i. nem a felengedés utáni elég hosszú idő elteltével következett volna be a koagulálás, hanem azonnal. Valószínűleg hasonló folyamat játszódhatott le a 0 °C-on tartott élesztő-tenyészet sejteiben is.

Miért nem következik be az ilyen természetű fagyhalál a hidegebb végső hőmérsékletre hűtött szervezeteknél? Erre a kérdésre ad választ a —20 °C-ra lassan fagyasztott élesztőtenyészetek sejtszám értékeinek alakulása. A lassú hűtés alatt — mint az a 0 °C-on tartott tenyészetnél látható — az élesztő-tenyészet sejtszáma még emelkedhet. Ez a —20 °C-ra lassan fagyasztott tenyészeteknél is bekövetkezett. Mihelyt azonban a tenyészetek hőfoka olyan alacsony, hogy vagy a teljes sejtszám vagy annak víztartalma megfagy, a szilárd állapotba kerülő »befagyott« rendszerben az enzimek akár organizált, akár dezorganizáció felé tartó működése nagymértékben lelassul, ill. megszűnik s a »befagyott rendszernek ideje sincs« a koagulációra, következésképpen a sejtek a fagyasztás tartalma alatt életben maradnak. Felengedés után azonban a megkezdődött enzimatiskus folyamat most már rohamosan lejátsszódhat, a bomlott enzim-egyensúlyú sejtek gyorsan elpusztulnak. Ezt mutatja a —20 °C-ra lassan fagyasztott tenyészet felengedés utáni fejlődési görbéje, ahol a sejtszám logaritmususa az első 3 órában egy teljes nagyságrenddel csökkent. (Kérdéses, hogy a minimum nem esik-e a 3 órás időintervallum közé.) A folyamatot valószínűleg még elősegíti a lassú fagyasztás esetében fokozottabban jelentkező mechanikus sérülés (jégkristályok, jégnyomás stb.) folytán előálló sejtpusztulás is. E szemlélet alapján tehát a fagyhalál egyik tényezője a mechanikai sérülés és a dehidratáció mellett a megfagyás folytán különböző belső okokból *egyensúlyában megbomlott enzimrendszer*, mely lassú fagyás esetében még a szilárd fázis kialakulása előtt is igen nagyfokú belső változást okozhat. Gyorsabb megfagyásnál ez a változás a gyorsabban kialakuló szilárd fázis (»befagyás«) következtében kisebb. A fagyott sejt pusztulása nem szükségszerű, az fagyasztott állapotban — változott hidrárburok és enzimaktivitás mellett is — életben maradhat. A megfigyelhető fagyhalál ezek szerint inkább a felengedés után, ill. a felengedés általában lassú folyamata alatt következik be. Normális körülmények között a hőátadás (hőpenetráció) folyamata következtében szükségszerűen lassú felengedés alatt u. i. a lassú hűtéssel ellentétes, de azzal egyenértékű folyamatok lejátsszódására elegendő idő van. Lassú felengedéskor az enzimek aktivitásának regenerálódása enzimenként, szakaszosan ugyanúgy történik, mint lassú hűtés esetén, a szabályos összhangban lévő enzim-rendszer működési hőoptimumát csak aránylag hosszú idő után érheti el. Addig azonban az enzimfolyamatok a dezorganizáció

felé tartanak s kérdéses, hogy a sejt életben maradhat-e. A lassú felengedés tehát ugyanúgy eredményezhet irreverzibilis változásokat, mint a lassú hűtés. A fagyás utáni biológiai reverzibilitás, azaz a sejt fagyhalálának kérdése a felengedés sebességétől is *legalább* olyan mértékben függ, mint a fagyasztás sebességétől.

Miben mutatkozik a fagyasztás végső hőmérsékletének szerepe? Mint azt az élesztő-tenyészetek fagyasztás utáni fejlődési görbéi is mutatják, a  $-48^{\circ}\text{C}$ -ra gyorsan fagyasztott tenyészet szenvedte a kontrollhoz viszonyított legkisebb károsodást. Sejtszám értékei csökkenést nem mutatnak. Bár az alacsony végső hőfok több védelmet nyújt a fagyott szervezeteknek a fagyott állapotban esetleg mégis jelentkező belső átalakulások ellen (alacsonyabb hőfokon a sejtek befagyasztott állapota jobban érvényesül), ez azonban egymagában nem elég. A  $-40^{\circ}\text{C}$ -ra lassan hűtött élesztő-tenyészet felengedés utáni fejlődési görbéje alig tér el a  $-20^{\circ}\text{C}$ -ra gyorsan fagyasztottétól. Tehát az alacsony végső hőfok is a fagyasztás sebességét növeli. Lassú felengedéskor az alacsony hőfokra történő gyors fagyasztás előnyeinek nagy része elvész.

A fagyhalál okainak, ill. a biológiai reverzibilitás vizsgálata azonban egyoldalú lenne, ha nem vennénk tekintetbe a szervezet külső és belső (molekuláris és kolloid) strukturájának változását. A fagyasztás — akár lassú, akár gyors, akár alacsonyabb, akár magasabb véghőmérsékletű — mindig egyidejű részleges dehidratálással jár. A kialakuló jégkristályok és azok révén előálló nyomás a strukturát nagymértékben befolyásolja. Igen gyors és  $-50^{\circ}\text{C}$ -nál alacsonyabb hűtési véghőmérséklet esetén, amint az pl. a halikrákkal végzett kísérletek esetében is történt, az ikrák külső strukturája a fagyasztás után is alig változott. Az embrió és a külső burok, ill. annak folyadéktartalma áttetsző maradt, pedig az ikra megfagyott, a szív működés megállt. A rákövetkező gyors felengedés után az ikra strukturájában változás nem volt megfigyelhető s a meginduló és sokáig változatlanul megmaradó szív működés azt mutatta, hogy a megfagyás és az azt követő felengedés folyamata reverzibilis volt. T ö r ö k hívta fel a figyelmemet arra, hogy itt is (2, 16) a túlhűtött rendszer gyors, »amorf« állapotban történő megfagyása, üvegszerű megmerevedése, azaz vitrifikációja következett be. Mivel a kísérleti körülmények folytán a gyors felengedés közben sem léphetett fel — megfigyeléseim szerint — kristályosodás, a gyors devitrifikáció után a csukaembriók életképesek maradtak, a fagyasztás biológiailag reverzibilisnek mutatkozott. Ilyen vagy ehhez hasonló folyamat lejátszódását kell feltételezni a  $-48^{\circ}\text{C}$ -ra gyorsan fagyasztott, majd  $+26^{\circ}\text{C}$ -ra felengedett élesztőtenyészet esetében is, ezzel magyarázható ennek közel szabályos lefutású fejlődési görbéje. A fagyasztás alacsony véghőmérsékletének igen fontos szerepe tehát a vitrifikáció jelenségénél mutatkozik, az amorf rendszer befagyása, üvegesedése, u. i. csak alacsony hőfokon, megfelelően gyors hűtődés, azaz gyors hűtés mellett történhet meg kellő biztonsággal a plazmában szereplő anyagok figyelembevételével.

Ismertetett kísérleteim alapján feltételezhető, hogy a megfelelő körülmények között fagyasztott sejtek élő állapotban maradnak, és a sejtek pusztulása, koagulálása a dezorganizáció felé hajló enzimműködés következménye. Ennek eldöntésére a hűtött állapotú sejtek, illetve a hűtés és felengedés alatt bekövetkező enzimatiszus változások tanulmányozását tekintem munkám legközelebbi céljának. Az enzimatiszus folyamatok változásának vizsgálata adott körülmények között leginkább a légzési folyamatokban jelentkező változások, azaz a respirációs kvóciens változásának alacsony hőmérsékleten mérésével oldható meg. Ezért — mint már említettem — az alacsony hőmérsékleten mutató légzési együttható értékeinek, illetve a légzés intenzitásának mérésére a célnak megfelelő »bifunkcionális respirométert« szerkesztettem. A műszer tökéletesítése folyamatban van.

## Összefoglalás

Kísérleteket végeztem annak eldöntésére, hogy vajjon az élő sejtek halála fagy hatására szükségszerűen bekövetkezik-e vagy a fagyasztás módjának kellő megválasztásával a sejtek életben maradhatnak-e. E kérdés tehát azt dönti el, hogy a hideg hatásra a sejten belül feltétlenül bekövetkező változás biológiailag reverzibilis-e.

A kísérleteket — modell gyanánt — élesztő tenyészetekkel végeztem. 66 különböző *Saccharomyces* törzs —40 C°, ill. —20 C°-ra hűtve, mindegyik fajta még 2 heti tárolás után is életképesnek mutatkozott.

Az élő sejt-szám alakulása különböző módokon fagyasztott tenyészetekben felengedés után igen változó, a lassú, ill. magasabb véghőmérsékletű fagyasztás után a fejlődés görbéje minden esetben erős visszaesést mutat, a sejtek egy hányada, ill. azok utódai életképtelenné válnak, elpusztulnak. Alacsony véghőmérsékletű, gyors fagyasztás után azonban a fejlődési görbe a kontrol tenyészetéhez hasonló lefutású.

Halikrákon, mikroszkóp alatt végzett fagyasztási kísérletek is azt igazolják, hogy a gyors hűtés és alacsony hőfok esetén a csukaembriók biológiailag reverzibilisen viselkednek.

Kísérleteim tehát megerősítik, hogy a fagyasztás következtében beálló sejthalál összetett folyamatának tényezői között tekintetbe kell venni az enzimrendszerek dezorganizáció felé tartó működésének hatását is a valószínűleg igen alárendelt jelentőségű mechanikai roncsolás, valamint a már számottevőbb dehidratálási folyamat mellett. A sejtek plazmájának fagy hatására bekövetkező koagulálása valószínűleg csak az összetett folyamatok végső, irreverzibilis megnyilvánulása. A fagyasztás, ill. felengedés hatására az enzimrendszerekben végbemenő változások tanulmányozása további feladat.

Kísérleteim alapján feltételezhető, hogy a megfelelő körülmények között megfagyó sejtek élő állapotban fagnak meg, s mind a fagyasztás sebessége, ill. végső hőmérséklete, mind a felengedés sebessége nagy hatással van a sejtek fagyasztás utáni biológiai reverzibilitásának mértékére. A halikrákkal végzett megfigyelések alapján úgy látszik, hogy a biológiai reverzibilitás a vitrifikálás, ill. a devitifikálás feltételeinek betartása mellett teljes mértékű.

Érkezett : 1953. november 20.

## Irodalom

1. Almási, E. : Élelmezési Ipar 6. 82. 1952.
2. Almási, E. : Teljes vér reverzibilis fagyasztása (kézirat).
3. Csiba, L. : Élelmezési Ipar 5. 219. 1951.
4. Golovkin, N. A. & Csizsov, G. B. : Holodilnaja Technologija Piscsevih Produktov. Moszkva, Piscsepromizdal 1951.
5. Golus, B. M. : Trudi In-ta fiziol. raszt. im. Timirjazeva A. N. S. S. R. 1. (2) 1937.
6. Gortner, W. A., Erdman, F. S. & Mastermann, N. K. : Principles of Food Freezing. New York: Wilay & Sons; London: Chapman & Hall. 1948.
7. Maximov, N. A. : Zsurn. opütn. agron. 13. 1. 497, 1912.
8. Maximov, N. A. : Izv. Leszn. In-ta 25 1. 1913.
9. Maximov, N. A. : Trudi. po prikl. bot. gen. i szel. 22. 3. 1929.
10. Paech, K. & Loeser, E. : Die Gefrierkonservierung vom Gemüse, Obst und Fruchtsäften, Berlin, P. Parey 1941.



11. Plank, R. : Z. Allg. Physiol. 17. 221. 1918.
12. Török, G. : Mezőgazd. és Ipar 4. (7) 24. 1950.
13. Török, G. : A Magyar. Tud. Akad. Kémiai Osztályának közleményei 2. 117. 1952.
14. Tressler, D. K. & Evers, C. F. : The Freezing Preservation of Foods, New York, The Avi Co. 1947.
15. Tressler, D. K. : Ind. Eng. Chem. 24. 682. 1932.
16. Varga, I. : Mezőgazd. és Ipar 4. (12) 16. 1950.

## ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ

### I. ВОПРОС БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБРАТИМОСТИ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

О. Балаж

Исследовательский Институт Консервной, Мясной и Холодильной Промышленности,  
Будапешт

#### В ы в о д ы

Проводил опыты для решения того, наступает-ли смерть живых клеток по необходимости под влиянием мороза или же соответственным выбором способа замораживания клетки могут остаться живыми. Этот вопрос следовательно решает, что изменение безусловно наступающее внутри клеток под влиянием мороза биологически обратимое, или нет.

Опыты — в качестве модели — я проводил с культурами дрожжей. 66 различных штаммов *Saccharomyces* охлажденные на  $-40^{\circ}\text{C}$ , или  $-20^{\circ}\text{C}$  все оказались живыми и после 2-недельного хранения.

Число живых клеток в культурах замораженных различным образом после оттаивания складывается очень различно; после замораживания при более высокой терминальной температуре кривая развития покажет в каждом случае сильное падение, часть клеток, или же их потомки становятся нежизнеспособными и отмирают. Однако после быстрого замораживания при более низкой терминальной температуре ход кривой развития сходной с контрольными культурами.

Эксперименты замораживания, проведенные под микроскопом с икрой также подтверждают, что в случае быстрого охлаждения и низкой температуры поведение зародышей шухи биологически обратимое.

Итак мои опыты подтверждают, что между факторами сложного процесса смерти клеток вследствие замораживания нужно иметь ввиду и влияние деятельности ферментов идущее в направлении дезорганизации вместе с правдоподобно незначительными механическими повреждениями и с более важным дегидрационным процессом. Коагуляция плазмы клеток под влиянием мороза является правдоподобно только последним необратимым проявлением сложных процессов. Изучение изменений, происходящих под влиянием замораживания, или оттаивания является задачей дальнейших исследований.

На основе моих опытов можно предполагать, что замерзающие при соответственных условиях клетки замерзают в живом состоянии, а скорость и терминальная температура замораживания, а также и скорость оттаивания очень сильно влияют на степень биологической обратимости клеток после замораживания. Из экспериментов, проведенных с икрой видно, что биологическая обратимость при выполнении условий витрификации, или девитрификации является полной.

Т а б л. 1. Определение величины числа живых клеток, служащих основой кривой развития в контрольных, хранившихся при  $+26^{\circ}\text{C}$  культурах. (1) Порядковый номер, (2) Средние величины количества клеток отсчитанного при различных разбавлениях, (3) логарифмы величин количества клеток, отсчитанного в отдельных группах, (4) логарифмы оцениваемого количества клеток, (5) максимальная погрешность.

Р и с. 1. Гигантские колонии дрожжей разного сорта. а) замораженные, в) контроль, того же сорта и возраста. 1, 2, 3: после замораживания при  $-20^{\circ}\text{C}$ ; 4, 5, 6, 7: при  $-40^{\circ}\text{C}$ .

Р и с. 2. Временный ход кривых развития культур дрожжей обработанных различным образом, по фактическому определению эксперимента. 1: Термостатный контроль при  $+26^{\circ}\text{C}$ . 2: В леднике при  $0^{\circ}\text{C}$ . 3: Медленное замораживание при  $-26^{\circ}\text{C}$  в изолированном коробе. 4: Скоро-замораживание при  $-20^{\circ}\text{C}$  в соленом растворе. 5: Медленное замораживание при  $-40^{\circ}\text{C}$  в изолированном коробе. 6: Скоро-замораживание при  $-48^{\circ}\text{C}$ .

Рис. 3. Изменение температуры дрожжевых культур, обработанных различным образом в течение опыта.

Рис. 4. Сопоставление кривых развития контрольной и быстро замороженной при  $-48^{\circ}\text{C}$  дрожжевых культур.

Рис. 5. Микроскопическое изображение 14—15-дневного зародыша.

## The Effect of Freezing on Living Organisms

### I. The problem of biological reversibility in freezing

O. BALÁZS

Institute for Research in Canning, Meat Packing and Refrigeration, Budapest

#### Summary

Experiments have been carried out by the author with the objective to prove whether living cells are necessarily destroyed by the process of freezing or whether it is possible to preserve them by an adequate method of freezing, in other words, whether the changes occurring in cells during freezing are biologically reversible.

Yeast cultures served as models in the experiments. 66 various strains of *Saccharomyces* stored at  $-40^{\circ}$  and  $-20^{\circ}\text{C}$  for 14 days did not lose their viability.

The number of living cells in cultures frozen by different methods was very varying after thawing. The curves of development showed a definite drop after a slow freezing as well as when freezing at a higher terminal temperature. A number of cells and their progeny became non-viable and perished. However, subsequently to a quick freezing at a low terminal temperature the curves of cell development were similar to those of the control cultures.

Freezing experiments carried out on roes under the microscope also confirmed that pike embryos behave biologically reversibly in case of quick freezing at low temperature.

Thus the experiments corroborate that besides the mechanical destruction of probably minor importance, and the dehydration process of somewhat greater importance, also the effect of enzymatic systems with a trend towards disorganisation must be considered as a factor in the complex process of cell death due to quick freezing. The coagulation of cell plasma as a result of freezing is probably the final irreversible manifestation of these complex processes. The study of changes of the enzymatic system during freezing and thawing represents a further task.

On the basis of the experiments it can be presumed that cells frozen under adequate conditions remain in a living state. The rate and terminal temperature of freezing as well as the rate of thawing affects to a great extent the biological reversibility of frozen cells. On the basis of observations on roes it seems that the biological reversibility might be complete when the conditions of vitrifying and devitrifying, respectively, are sufficiently secured.

Table 1. Determination of the number of living cells, as a basis for plotting the curves of cell development in the control cultures stored at  $26^{\circ}\text{C}$ . (1) Serial number. (2) Mean values of cell numbers read in various dilutions. (3) Logarithms of cell numbers read in the various groups. (4) Mean values of logarithms of evaluable cell numbers. (5) Maximal error.

Fig. 1. Giant cultures of yeast of different type. a) frozen. b) controls of identical type and age, after freezing to  $-20^{\circ}\text{C}$  (1, 2, 3) and  $-40^{\circ}\text{C}$  (4, 5, 6, 7) respectively.

Fig. 2. Development curves of yeast cultures under various treatments, according to the actual order of the experiments. 1.: Control, in a thermostat of  $+26^{\circ}\text{C}$ . 2.: At about  $0^{\circ}$ , in an electric refrigerator. 3.: Slowly frozen to  $-20^{\circ}\text{C}$ , in a jacket of multiple cotton layers, in a container of  $-20^{\circ}\text{C}$ . 4.: Quick-frozen to  $-20^{\circ}\text{C}$ , by immersion in a salt liquor of  $-20^{\circ}\text{C}$ . 5.: Slowly frozen to  $-40^{\circ}\text{C}$ , in a jacket of multiple cotton layers, in a container of  $-40^{\circ}\text{C}$ . 6.: Quick-frozen to  $-48^{\circ}\text{C}$ , by immersion in a salt liquor of  $-48^{\circ}\text{C}$ .

Fig. 3. The change of temperature in yeast cultures under various treatments.

Fig. 4. Comparison of development curves of yeast cultures quick-frozen to  $48^{\circ}$  and untreated, respectively.

Fig. 5. Microphotograph of fish embryo aged 14—15 days.